

B.G.
B9
Istituto di Patologia Generale della R. Università di Napoli
diretto dal Prof. G. Galeotti

Sulla curva di assorbimento di
varî pigmenti batterici, determi-
nata allo spettrofotometro

VITTORIO SCAFFIDI
375

*Estratto dalla "Gazzetta Internazionale di Medicina, Chirurgia
Igiene, Interessi Professionali", Organo Settimanale
Napoli, Via Broggia 13 - N. 50 - 1913*



NAPOLI

Stabilimento Tipografico Fratelli Ruggiano

Vico Fico al Purgatorio ad Arco, 1

1913

Istituto di Patologia Generale della R. Università di Napoli
diretto dal Prof. G. Galeotti

Sulla curva di assorbimento di varî pigmenti batterici, determi- nata allo spettrofotometro

VITTORIO SCAFFIDI

*Estratto dalla "Gazzetta Internazionale di Medicina, Chirurgia
Igiene, Interessi Professionali", Organo Settimanale
Napoli, Via Broggia 13 - N. 50 - 1913*



NAPOLI
Stabilimento Tipografico Fratelli Ruggiano
Vico Fico al Purgatorio ad Arco, 1
1913

L'esame spettroscopico di sostanze colorate, le quali non presentino uno spettro caratteristico, con strie di assorbimento ben definite, come è il caso del maggior numero dei pigmenti batterici sino adesso esaminati allo spettroscopio, non può dare una esatta conoscenza delle caratteristiche che, i pigmenti presentano alla indagine spettrofotometrica, giacchè l'esame deve essere limitato ad un apprezzamento approssimativo della perdita della intensità luminosa dei vari campi dello spettro, cosa che non è possibile di definire esattamente, all'esame spettroscopico per la natura stessa dei mezzi di esame impiegati.

E' noto difatti che non si è di accordo sui risultati ottenuti dai vari esami spettroscopici compiuti su pigmenti batterici; mentre p. es. per la sostanza colorante dello stafilococco piogene aureo sono state ammesse da Zopf due strie in F e tra F e G, Schneider nega l'esistenza di tali strie; così pure mentre Griffith assegna al pigmento del prodigioso una stria di assorbimento nell'azzurro e una nel verde, Schneider ammette una stria di assorbimento tra il giallo e il verde, e una zona di assorbimento, meno nettamente definita, che si estenderebbe dal verde al violetto. Dalle stesse accurate ricerche di Schneider su vari pigmenti batterici, risultano determinazioni che non lasciano un'idea esatta delle caratteristiche spettroscopiche delle sostanze studiate, giacchè le osservazioni non potevano

che essere limitate ad un apprezzamento approssimativo della luce sottratta alle diverse zone dello spettro.

L'esame spettrofotometrico per la definizione dello spettro dei pigmenti batterici, presenta il vantaggio di dare un'idea esatta della quantità di luce da essi veramente assorbita nei vari campi dello spettro stesso, in modo da potere esattamente apprezzare la posizione, la estensione, e la intensità delle strie di assorbimento per le sostanze il cui spettro presenta delle vere e proprie strie; nonchè la quantità relativa di luce assorbita nelle varie zone dello spettro, per le sostanze che non posseggono strie nette e definite, come è appunto del maggior numero dei pigmenti batterici.

I pigmenti da me esaminati appartengono alle seguenti specie batteriche :

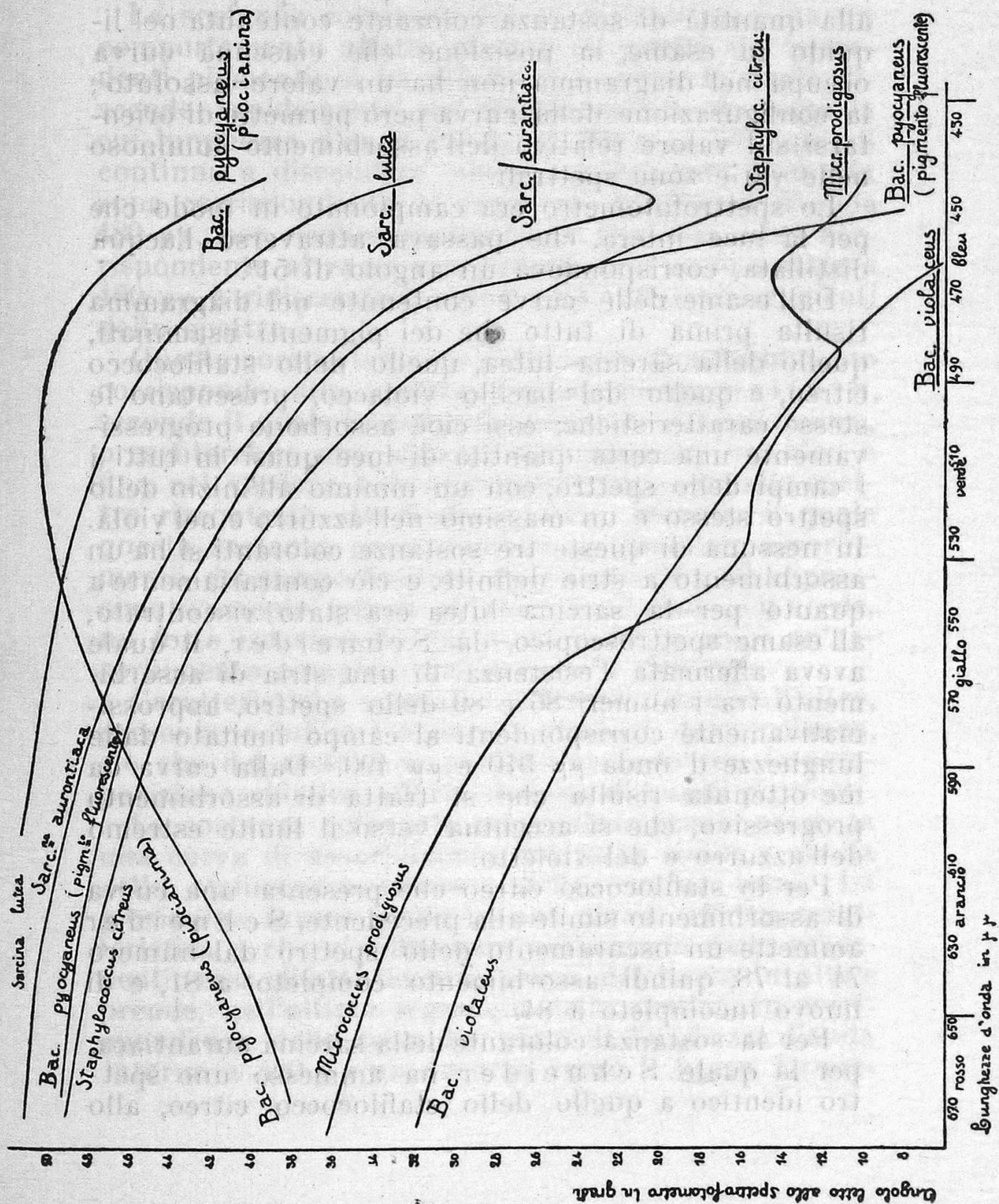
- 1° sarcina lutea ;
- 2° sarcina aurantiaca ;
- 3° staphylococcus citreus ;
- 4° micrococcus prodigiosus ;
- 5° bacillus violaceus ;
- 6° bacillus pyocyaneus :

I pigmenti sono stati ottenuti dalla patina di culture fresche, mercè estrazione con alcool allungato con acqua, per la sarcina aurantiaca, lo stafilococco e il violaceo, e con acqua leggermente alcalina per il micrococco prodigioso e la sarcina lutea. Dal piociano fu estratta la piocianina con cloroformio, e venne preparato un estratto acquoso della sostanza colorante fluorescente. Questo estratto acquoso, stando alle ricerche di B a b e s, di G e s s a r d e di R o h r e r, si deve considerare come risultante dalla miscela di due pigmenti che, oltre la piocianina, sono prodotti dal piociano, entrambi solubili in acqua.

Le osservazioni sono state compiute con lo spettrofotometro König-Martens. Non avendo interesse alcuno, per la natura e lo scopo della ricerca, e anche per il fatto che non è facile stabilire con esattezza il contenuto in pigmento delle varie soluzioni esaminate, la determinazione del coefficiente di estinzione, mi sono limitato, sia per la costruzione delle curve sia nella compilazione dei protocolli a tenere

semplicemente conto degli angoli direttamente letti al quadrante del Nicol analizzatore.

I risultati dell'esame spettrofotometrico dei pigmenti studiati sono graficamente riprodotti nel diagramma che segue.



Per la giusta comprensione del diagramma va notato che le curve in esso contenute sono costruite con i valori dell'angolo letto allo spettrofotometro, per la lunghezza d'onda corrispondente ai vari segmenti dello spettro. Va inoltre notato che, rilevandosi allo spettrofotometro la quantità di luce effettivamente assorbita, ed essendo questa proporzionale alla quantità di sostanza colorante contenuta nel liquido in esame, la posizione che ciascuna curva occupa nel diagramma non ha un valore assoluto; la configurazione della curva però permette di orientarsi sul valore relativo dell'assorbimento luminoso nelle varie zone spettrali.

Lo spettrofotometro era campionato in modo che per la luce intera, che passava attraverso l'acqua distillata, corrispondeva un angolo di 51° .

Dall'esame delle curve contenute nel diagramma risulta prima di tutto che dei pigmenti esaminati, quello della sarcina lutea, quello dello stafilococco citreo, e quello del bacillo violaceo, presentano le stesse caratteristiche; essi cioè assorbono progressivamente una certa quantità di luce quasi in tutti i campi dello spettro, con un minimo all'inizio dello spettro stesso e un massimo nell'azzurro e nel viola. In nessuna di queste tre sostanze coloranti si ha un assorbimento a strie definite, e ciò contrariamente a quanto per la sarcina lutea era stato riscontrato, all'esame spettroscopico, da Schneider, il quale aveva affermata l'esistenza di una stria di assorbimento tra i numeri 86 e 89 dello spettro, approssimativamente corrispondenti al campo limitato dalle lunghezze d'onda $\mu\mu$ 510 e $\mu\mu$ 490. Dalla curva da me ottenuta risulta che si tratta di assorbimento progressivo, che si accentua verso il limite estremo dell'azzurro e del violetto.

Per lo stafilococco citreo che presenta una curva di assorbimento simile alla precedente, Schneider ammette un oscuramento dello spettro dal numero 74 al 78, quindi assorbimento completo a 81, e di nuovo incompleto a 84.

Per la sostanza colorante della sarcina aurantiaca, per la quale Schneider ha ammesso uno spettro identico a quello dello stafilococco citreo, allo

spettrofotometro si ottiene una curva corrispondente alle curve dei tre pigmenti di cui sopra, la quale però giunta verso il limite tra l'azzurro e il violetto, si porta di nuovo in alto, ciò che corrisponde alla diminuzione di assorbimento, in tale zona dello spettro, notata da *Schneider*, per il pigmento dello stafilococco citreo e della sarcina aurantiaca.

La sostanza colorante del prodigioso presenta un comportamento affatto diverso da quello dei precedenti pigmenti: si ha difatti una curva la quale discende rapidamente nel tratto limitato da raggi la cui lunghezza d'onda va da $\mu\mu$ 560 a $\mu\mu$ 510, quindi continua a discendere meno rapidamente fino alla zona corrispondente ai raggi con lunghezza d'onda 480 $\mu\mu$, per risalire rapidamente fino alla zona corrispondente ai raggi con lunghezza d'onda uguale a 460 $\mu\mu$ e ridiscendere infine negli ulteriori segmenti dello spettro.

Questo comportamento della curva di assorbimento corrisponde allo spettro riscontrato da *Griffith*, secondo il quale la sostanza colorante del prodigioso, presenterebbe una stria di assorbimento nel bleu e una nel verde; e solo approssimativamente allo spettro riscontrato da *Schneider*, secondo il quale questa sostanza presenterebbe un completo assorbimento del campo limitato dai numeri 66 e 70, approssimativamente quindi al limite tra il giallo e il verde, un forte iscurimento dal numero 70 in poi, e un assorbimento completo dell'azzurro e del viola.

Caratteristiche speciali e differenti l'uno dall'altro, presentano infine i pigmenti ottenuti dal piociano, ciò che del resto è in perfetto accordo con la composizione chimica affatto diversa di questi pigmenti.

La sostanza colorante estraibile in acqua, presenta una curva di assorbimento del tutto simile a quella dello stafilococco citreo e della sarcina lutea. La piocianina invece presenta una curva affatto caratteristica e che si differenzia nettamente dalle precedenti: essa difatti decorre prima dal basso in alto e prende, nell'ultimo segmento dello spettro, in corrispondenza della zona dei raggi di lunghezza d'onda intorno a 490 $\mu\mu$ un decorso verso il basso. La pio-

cianina quindi assorbe un largo tratto dello spettro in corrispondenza del rosso e dell'arancio, l'assorbimento diventa nullo in corrispondenza del giallo e del verde e ricompare in corrispondenza dell'azzurro.

Dei pigmenti esaminati quindi, quattro assorbono i vari campi dello spettro da un minimo, che si può considerare uguale a zero, nel rosso; l'assorbimento aumenta gradatamente nell'arancio, nel giallo e nel verde e si accentua mercatamente nell'azzurro: dalla rapidità con cui le singole curve si portano verso il basso si deduce che la quantità di luce assorbita in questa ultima zona dello spettro è specialmente spiccata per la sostanza fluorescente del piocianeo, e per il pigmento della sarcina lutea e dello stafilococco citreo.

Per questi pigmenti, come per la sostanza colorante della sarcina aurantiaca, non si può parlare di vere strie di assorbimento progressivo dello spettro, specialmente in corrispondenza dell'azzurro.

Per la sostanza colorante della sarcina aurantiaca però, nel limite tra il bleu e il violetto, in corrispondenza della zona di raggi di lunghezza d'onda di $\mu\mu$ 450, l'assorbimento della luce, massimo in tale punto, ricomincia a diminuire.

Il comportamento della curva del pigmento del micrococco prodigioso, corrisponde ad uno spettro nel quale il campo compreso tra raggi con lunghezza d'onda di 530 a 485 $\mu\mu$ si deve risolvere in una stria di assorbimento limitata da due campi in cui l'assorbimento è minore, e tra i quali essa spicca quindi nettamente; dalla zona corrispondente ai raggi con lunghezza d'onda di 465 $\mu\mu$ in poi si deve risolvere in una lunga bande di assorbimento progressivo.

La curva corrispondente alla piocianina si risolve in uno spettro in cui ad un'ampia banda di assorbimento nel rosso e nell'arancio, segue un lungo tratto, comprendente parte dell'arancio, il verde e parte dell'azzurro, in cui la luce viene assorbita meno intensamente; e infine da una zona che prende origine dall'ultimo segmento del campo occupato dall'azzurro e si porta verso il violetto, in cui si ha un manifesto energico assorbimento della luce.

BIBLIOGRAFIA

- BABES — C. r. Soc. biologie, 1889.
FLÜGGE — Die Mikroorganismen. Leipzig, 1896.
GESSARD — La Semaine médicale, 1890.
GRIFFITH — Vedi FLÜGGE.
MAÇÉ — Traité pratique de bacteriologie. Paris 1901.
MIGULA — System der Bakterien. Jena 1900.
SCHNEIDER — Arch. aus dem bakt. Inst. d. Techn. Hochschule
zu Karlsruhe, Bd. 1, 1894.
ZOPF — Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie. Bd. 6, 1889.
Botanische Zeitung 1889.

Protocolli delle determinazioni spettrofotometriche

Sarcina lutea (Pigmento estratto in NaOH all' 1 %)

Angolo letto allo spettro-	Lunghezza d'onda in μ	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda
50,8	596	49,6	552,0	47,2	518	45,2	493,5	42,5	473	40,0	457,8	34,5	447,5
50,4	591	48,8	547,5	48,0	515,2	45,0	491,5	42,0	471	38,8	456,6	33,4	446,5
50,0	586	48,8	544	47,6	512,5	45,0	489,5	40,6	469,8	38,6	455,4	32,4	445,7
50,2	582	48,1	540	46,8	510	44,2	487	40,8	468	37,0	454,5	33,0	444,9
50,5	577,5	48,0	536,5	47,2	507,5	44,0	485	38,5	466,5	37,0	453,4	33,6	444,1
50,2	572,5	49,0	533	47,8	505	44,5	482,5	38,6	465	37,0	452,4	33,2	443,3
50,0	567,5	48,6	530	45,4	502,5	44,0	480,5	40,0	463,5	37,2	451,5	34,0	442,5
49,4	564,0	48,0	527	46,8	500	44,0	478,5	41,0	462	36,0	450,5		
49,0	560,0	48,4	524	46,2	497,8	43,0	476,5	40,6	460,5	36,0	449,5		
49,1	555,5	48,0	521	46,8	495,5	41,0	475	39,5	459	35,9	448,5		

Sarcina aurantiaca (Pigmento in soluzione idroalcolica)

Angolo letto- allo spettro- fotometro	Lunghezza d'onda in μ	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda
51,0	670	48,8	602	45,5	547,5	40,2	510	35,0	482,5	28,2	462	22,0	447,5
51,0	665	48,6	598	45,0	544	40,0	507,5	34,6	480,5	28,0	460,5		
50,8	657	48,4	592	44,2	540	40,0	505	34,4	478,5	27,0	459		
50,4	652	48,0	586	44,2	536,5	39,5	502,5	34,0	476,5	26,0	457,8	21,0	445,7
50,4	640	47,5	582	43,5	533	38,8	500	33,0	475	25,0	456,6		
50,4	638	47,2	577,5	43,0	530	37,0	497,8	32,5	473	24,0	455,4	24,0	444,1
50,4	635	46,8	572,5	42,8	527	37,5	495,5	32,0	471				
50,0	627	46,8	567,5	42,0	524	37,2	493,5	31,0	469,8	22,5	453,4	23,0	442,5
50,0	622	46,6	564	41,6	521	36,8	491,5	30,0	468				
49,5	618	46,6	560	41,4	518	36,4	489,5	29,5	466,5	20,0	451,5	27,0	440,4
49,5	612	46,4	555,5	40,8	515,2	36,0	487	29,0	465				
49	606	46,0	552	40,4	515,2	35,5	485	28,5	463,5	22,0	449,5		

Microc. prodigiosus (Pigmento estratto in NaOH all' 1 %)

Angolo letto- allo spettro- fotometro	Lunghezza d'onda in μ	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda
35,8	670	30,4	602	19,0	547,5	14,6	510	11,5	482,5	14,0	462
35,2	665	30,2	598	18,2	544	14,6	507,5	12,5	480,5	13,4	460,5
35,2	657	29,7	592	16,5	540	13,4	505	12,0	478,5	13,0	459
34,5	652	28,7	586	15,8	536,5	14,0	502,5	12,0	476,5	12,4	457,8
33,8	640	28,1	582	15,8	533	14,0	500	12,6	475	12,6	456,6
34,0	638	27,8	577,5	15,5	530	13,4	497,8	14,5	473	11,8	455,4
33,7	635	27,0	572,5	15,2	527	12,4	495,5	14,4	471	12,0	454,5
33,6	627	26,3	567,5	16,0	524	12,0	493,5	14,2	469,5	11,4	453,4
32,5	622	25,8	564	15,2	521	12,6	491,5	14,4	468	12,0	451,5
32,0	618	24,9	560	15,8	518	11,8	489,5	14,0	466,5	11,0	449,5
31,2	612	23,2	555,5	15,4	515,2	11,4	487	14,8	465	11,5	447,5
30,8	606	21,2	552	14,4	512,5	10,8	485	14,6	463,5	11,0	445,7

Bac. violaceus (Pigmento in soluzione idroalcolica)

Angolo letto allo spettro- fotometro	Lunghezza d'onda in μ	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda
31,8	670	28,2	618	23,0	572,5	19,0	536,5	14,8	507,5	11,5	487
31,0	665	27,0	612	22,8	567,5	19,0	533	14,0	505	10,9	485
30,8	657	26,4	606	22,3	564	19,0	530	14,2	502,5	10,8	482,5
30,5	652	25,8	602	23,0	560	18,0	527	13,5	500	10,5	480,5
30,0	640	25,8	598	21,4	555,5	17,6	524	13,0	497,8	10,5	478,5
29,8	638	25,3	592	21,0	552	17,2	521	12,8	495,5	10,2	476,5
29,5	635	24,6	586	20,2	547,6	16,6	518	12,2	493,5	9,8	475
29,0	625	24,0	582	19,6	544	16,5	515,2	12,0	491,5	9,8	473
28,7	622	23,8	577,5	18,9	540	15,6	510	11,8	489,5	9,8	471

Bac. pyocyaneus (Estratto cloroformico di piocianina)

Angolo letto allo spettro- fotometro	Lunghezza d'onda in μ	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda
39,0	670	44,0	602	47,9	547,5	50,5	510	48,6	482,5
39,5	665	44,2	598	47,4	544	50,8	507,5	50,0	480,5
39,0	657	45,0	532	48,8	540	50,0	505	49,0	478,5
39,7	652	45,5	586	48,8	536,5	49,6	502,5	49,0	476,5
40,0	640	46,0	582	49,0	533	50,0	500	49,0	475
39,9	638	45,8	577,5	49,0	530	49,3	497,8	49,0	473
40,0	635	46,5	572,5	49,8	527	49,8	495,5	49,0	471
41,0	627	47,3	567,5	49,0	524	49,3	493,5	48,0	469,8
42,0	622	47,3	564	50,4	521	49,0	491,5	48,0	468
42,0	618	47,8	560	50,4	518	49,4	489,5	47,0	468,5
43,0	612	48,0	555,5	50,0	515,2	49,6	487	47,0	465
43,3	607	48,1	552	49,5	512,5	49,0	485	46,8	463,5

Bac. pyocyaneus (Pigmenti solubile in acqua)

Angolo letto allo spettro- fotometro	Lunghezza d'onda in $\mu\mu$	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda	Angolo	Lunghezza d'onda
48,8	670	47	592	42	533	36,8	495,5	28	468
48,9	665	46,5	586	41,4	530	36,6	493,5	27,5	466,5
49	657	46	582	41	527	36,5	491,5	23	465
49,2	652	46	577,5	41	524	36,2	489,5	21,8	463,5
49	640	45,9	572,5	40,7	521	36,4	487	18	462
48,4	638	45	567,5	40	518	34,8	485	18	460,5
48	635	45	564	39,6	515,2	34	482,5	17,5	459
47,9	627	44,5	560	39,5	512,5	34	480,5	16,8	457
47,5	622	44,5	555,5	39	510	34	478,5	12	455,4
47,5	618	43,5	552	38,8	507,5	32,8	476,5	10,5	453,4
47,2	612	43,2	547,5	39	505	32,6	475	8,5	451,5
47,5	606	43,3	544	38,4	502,5	32	473	8	450,5
46,8	602	43	540	37	500	30,8	471		
46,6	598	42,5	536,5	37	497,8	27,8	469,8		

